



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 3月 1日

出願番号

Application Number:

特願2001-057145

[ST.10/C]:

[JP2001-057145]

出願人

Applicant(s):

キヤノン株式会社

2002年 3月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2002-3019177

【書類名】 特許願

【整理番号】 4269008

【提出日】 平成13年 3月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/62
C07C 51/00

【発明の名称】 新規化合物 5 - (4 - フルオロチオフェノキシ) 吉草酸、側鎖に置換されたチオフェノキシ構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法

【請求項の数】 27

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社 社内

 【氏名】 見目 敬

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社 社内

 【氏名】 今村 剛士

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社 社内

 【氏名】 本間 務

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社 社内

 【氏名】 矢野 哲哉

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会

社内

【氏名】 須川 悦子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 鈴木 智博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 野本 毅

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

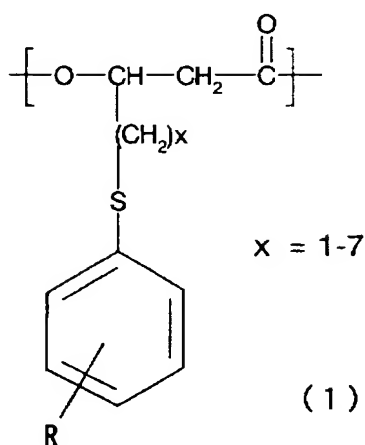
【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規化合物 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸、側鎖に置換されたチオフェノキシ構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 化学式(1)で示すユニットを分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエート。

【化 1】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

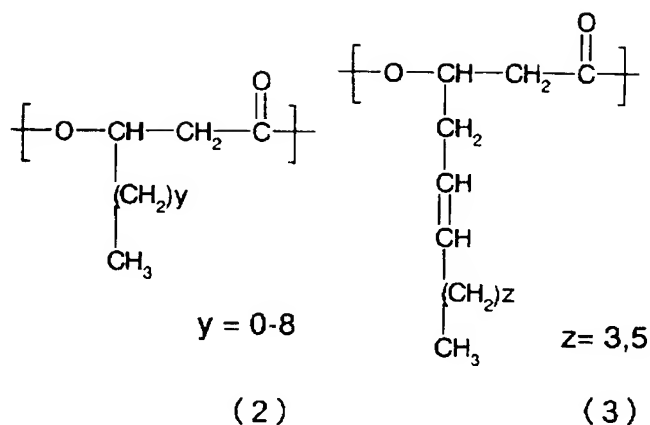
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【請求項 2】 化学式(1)に示されるユニット以外に、化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一方を含む、請求項 1 に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化 2】

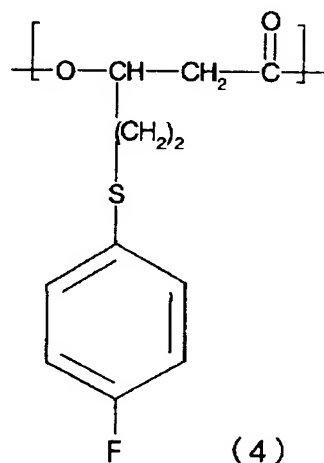


y 及び z は(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る。

【請求項 3】 数平均分子量が 10000 から 300000 の範囲である請求項 1 または 2 に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項 4】 化学式(4)に示す、3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフエノキシ)吉草酸ユニットを含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

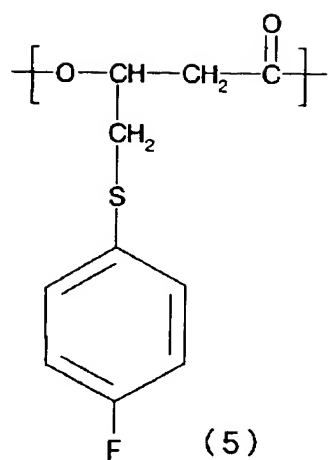
【化 3】



【請求項 5】 化学式(5)に示す、3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフエノキシ)酪酸ユニットを含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヒドロキ

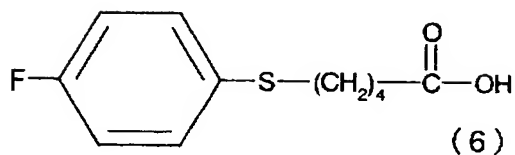
シアルカノエート。

【化 4】



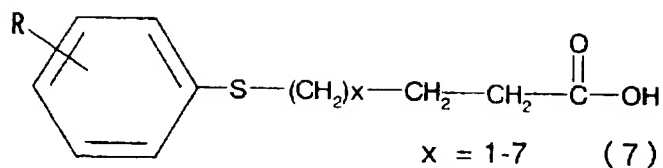
【請求項 6】 化学式(6)で表される 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸。

【化 5】



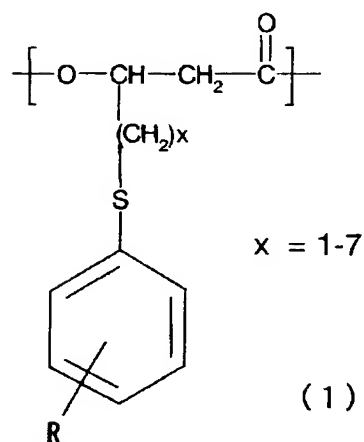
【請求項 7】 化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種以上含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化 6】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''」
 (R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」
 から任意に選択される。

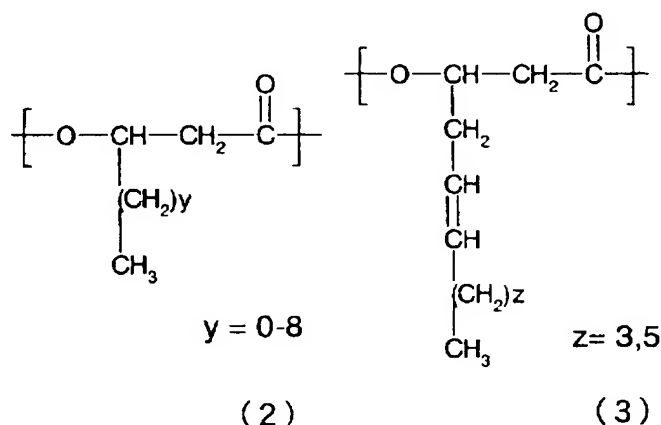
【化 7】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''」
 (R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」
 から任意に選択される。
 また、xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を
 一つ以上とり得る。

【請求項 8】 化学式(1)に示されるユニット以外にのユニットとして、化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一方を含む、請求項 7 に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化 8】



y 及び z は(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る。

【請求項 9】 該培地中にポリペプトンが含まれている請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】 該培地中に酵母エキ스가含まれている請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 11】 該培地中に糖類が含まれている請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 12】 該糖類がグリセロアルデヒド、エリスロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリスリトール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースから選ばれる 1 種類以上の化合物である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 該培地中に有機酸或いはその塩が含まれている請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 14】 該有機酸或いはその塩がピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸或いはその塩から選ばれる 1 つ以上の化合物である請求項 13 に記載の方法。

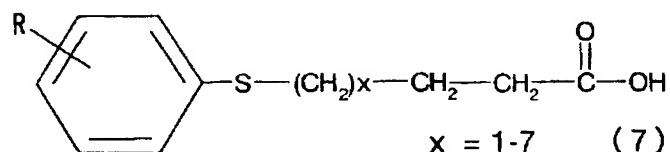
【請求項 15】 該培地中にアミノ酸或いはその塩が含まれている請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 6】 該アミノ酸或いはその塩がグルタミン酸、アスパラギン酸、或いはその塩から選ばれる 1 つ以上の化合物である請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】 該培地中に炭素数 4 から 1 2 の直鎖アルカン酸或いはその塩が含まれている請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 8】 化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程 1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ有機酸或いはその塩とを含む培地中で、工程 1 で培養された微生物を更に培養する工程(工程 2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化 9】

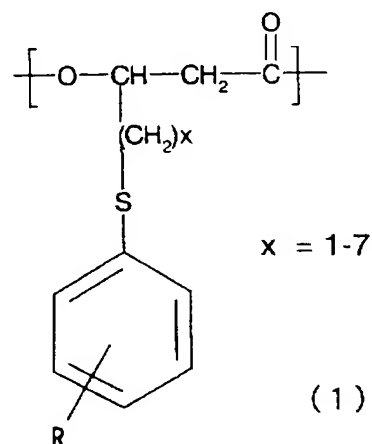


但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

【化10】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

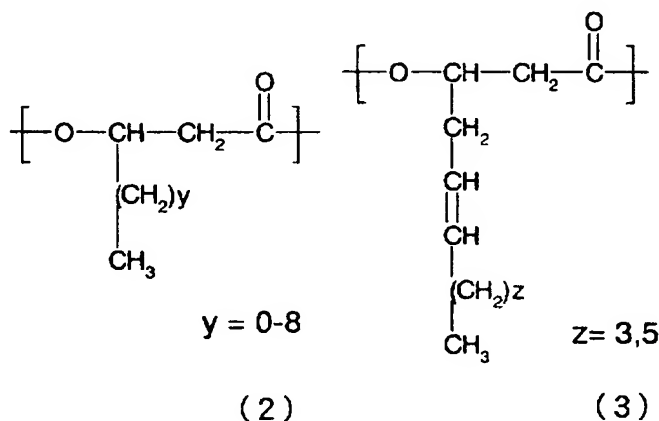
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【請求項19】 化学式(1)に示されるユニット以外のユニットとして、化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一方を含む、請求項18に記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化11】



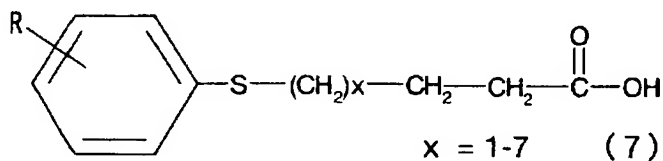
y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。

【請求項20】 該有機酸或いはその塩がピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、ク

エン酸、コハク酸或いはその塩から選ばれる1つ以上の化合物である請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】 化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつグルコースを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、またグルコースを含み、かつ窒素源を含まない培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化12】

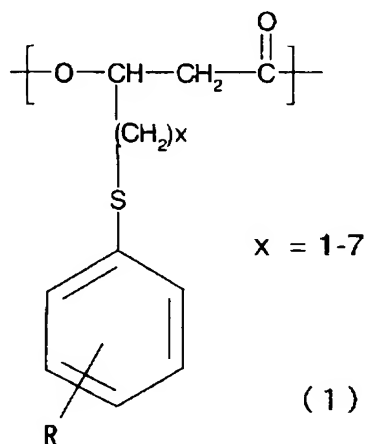


但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

【化13】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

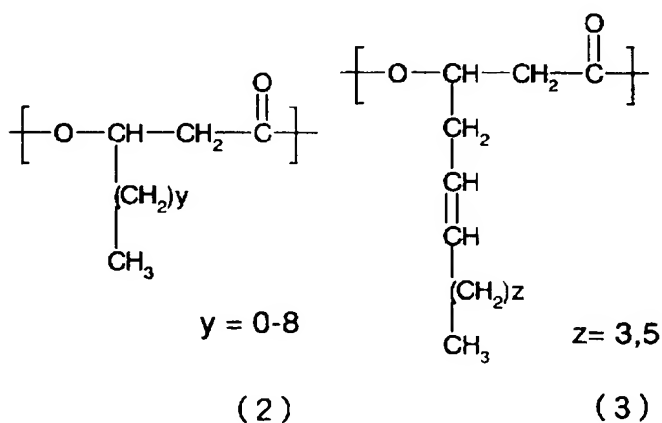
(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

また、xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【請求項22】 化学式(1)に示されるユニット以外のユニットとして、化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一方を含む、請求項21に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化14】

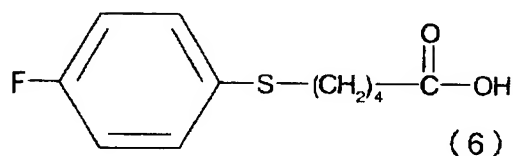


y及びzは(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。

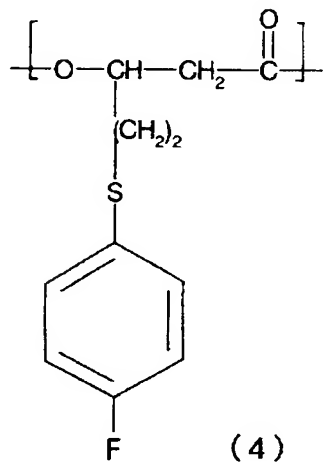
【請求項23】 化学式(6)で示される5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉

草酸を含む培地中で微生物を培養し、化学式(4)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産することを特徴とする、請求項4から21のいずれかに記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化15】

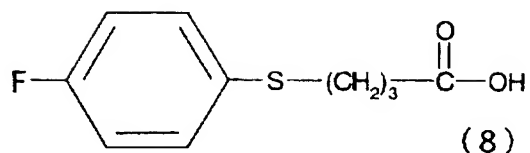


【化16】

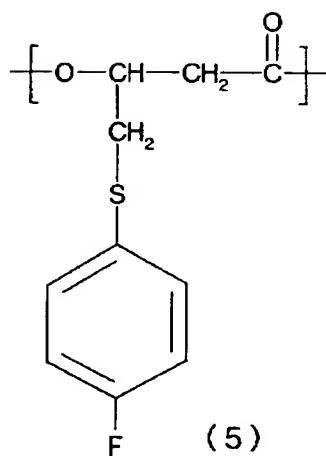


【請求項24】 化学式(8)で示される4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸を含む培地中で微生物を培養し、化学式(5)で示される3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)チオフェノキシ酪酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産することを特徴とする、請求項4から21のいずれかに記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化 1 7】



【化 1 8】



【請求項 2 5】 該微生物細胞からポリヒドロキシアルカノエートを回収する工程を含む請求項 4 から 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 6】 該微生物がシュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物である請求項 4 から 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 7】 該微生物がシュードモナス・チコリアイ YN 2 株(*Pseudomonas cichorii* YN 2 ; FERM BP-7 3 7 5)、シュードモナス・チコリアイ H 4 5 株(*Pseudomonas cichorii* H 4 5、FERM BP-7 3 7 4)、シュードモナス・ジェッセニイ P 1 6 1 株(*Pseudomonas jessenii* P 1 6 1、FERM BP-7 3 7 6)のいずれが 1 つ以上の株である、請求項 2 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なポリヒドロキシアルカノエート(以下、PHAと略す)に関する。また、PHAを生産し菌体内に蓄積する能力を有する微生物を用いた当該PHAの生産方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」, 生分解性プラスチック研究会編, (株)エヌ・ティー・エス, P178-197(1995))。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利点を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】

このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0004】

[1] まず、3-ヒドロキシ酪酸(以下、3HBと略す)をはじめとする比較的簡単な構造のモノマーユニットを重合させたPHAの生合成としては、次のものが挙げられる。

【0005】

(a) 3HBと3-ヒドロキシ吉草酸(以下3HV)を含むもの

特表平6-15604号公報、特表平7-14352号公報、特表平8-19227号公報等；特開平5-74492号公報

(b) 3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸(以下3HHx)を含むもの

特開平5-93049号公報、及び特開平7-265065号公報

(c) 3HBと4-ヒドロキシ酪酸(以下4HB)を含むもの

特開平9-191893号公報

(d)炭素数6から12までの3-ヒドロシアルカノエートを含むもの

特許公報第2642937号

(e)単一の脂肪酸を炭素源とした生合成。生産物は(d)とほぼ同様

Appl. Environ. Microbiol., 58(2), 746 (1992)

等が挙げられる。これらはいずれも微生物による炭化水素等の β 酸化や糖からの脂肪酸合成により合成された、いずれも側鎖にアルキル基を有するモノマーユニットからなるPHA、即ち、「usual PHA」である。

【0006】

[2]しかし、このような微生物産生PHAのより広範囲な応用、例えば機能性ポリマーとしての応用を考慮した場合、アルキル基以外の置換基を側鎖に導入したPHA「unusual PHA」が極めて有用であることが期待される。置換基の例としては、芳香環を含むもの(フェニル基、フェノキシ基、ベンゾイル基など)や、不飽和炭化水素、エステル基、アリル基、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、エポキシドなどが挙げられる。これらの中でも、特に、芳香環を有するPHAの研究が盛んになされている。

【0007】

(a)フェニル基もしくはその部分置換体を含むもの

Makromol. Chem., 191, 1957-1965(1990)及びMacromolecules, 24, 5256-5260(1991)には、5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス(Pseudomonas oleovorans)が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0008】

Macromolecules, 29, 1762-1766(1996)には、5-(4'-トリル)吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス(Pseudomonas oleovorans)が3-ヒドロキシ-5-(4'-トリル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0009】

Macromolecules, 32, 2889-2895(1999)には、5-(2',4'-ジニトロフェニル)吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-(2',4'-ジニトロフェニル)吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4'-ニトロフェニル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0010】

(b)フェノキシ基もしくはその部分置換体を含むもの

Macromol.Chem.Phys., 195, 1665-1672(1994)には、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0011】

特許公報第2989175号には、3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットあるいは3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されており、その効果として、置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撥水性を与えることができるとしている。

【0012】

この様なフッ素基置換体以外に、シアノ基やニトロ基の置換体の研究もなされている。

【0013】

Can.J.Microbiol., 41, 32-43(1995)及び Polymer International, 39, 205-213(1996)には、シュードモナス オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347 株及びシュードモナス プチダ(*Pseudomonas putida*) KT 2442

株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産が報告されている。

【0014】

これらの報告は側鎖がアルキル基である一般的なPHAとは異なり、いずれもPHAの側鎖に芳香環を有しており、それに由来する物性を有するポリマーを得る上で有益である。

【0015】

[3]また新たなカテゴリーとして、単に物性の変化に留まらず、側鎖に適当な官能基を有するPHAを生産し、その官能基を利用して新たな機能を生み出そうとする研究も行なわれている。

【0016】

例えばMacromolecules, 31, 1480-1486(1996)及び、Journal of Polymer Science:Part A:Polymer Chemistry, 36, 2381-2387(1998)などでは、側鎖の末端にビニル基を持つユニットを含むPHAを合成した後、酸化剤によりエポキシ化し、側鎖末端に反応性の高いエポキシ基を含むPHAを合成出来たと報告されている。

【0017】

またビニル基以外にも、高い反応性が期待されるチオエーテルを持つユニットを含むPHAの合成例として、Macromolecules, 32, 8315-8318(1999)においては、シュードモナス プチダ(Pseudomonas putida)27N01株が11-チオフェノキシ吉草酸を基質とし、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-チオフェノキシヘプタン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0018】

【本発明が解決しようとする課題】

これらのうち、3-ヒドロキシ-チオフェノキシアルカン酸ユニットを含むPHAに注目した場合、チオエーテルの反応性の高さから、機能性PHAを開発して

いく上で今後益々研究がなされていくものと予想される。しかし、この様な種類の P H A に関しては上に挙げた 1 例の報告があるに過ぎない。更に上記の方法は、炭素鎖長が長いカルボン酸を原料とし、微生物中で 2 炭素ずつ短縮していく β 酸化系を利用し、原料よりも炭素鎖の短い 3-ヒドロキシアルカン酸をポリマーのユニットとして取り込ませているため、ポリマー構造の制御が困難であるという問題があった。

【 0 0 1 9 】

本発明の目的は、チオエーテル構造を有する新規ヒドロキシアルカン酸と、これらの側鎖にチオエーテル構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート、およびその製造方法を提供することにある。

【 0 0 2 0 】

【課題を解決するための手段】

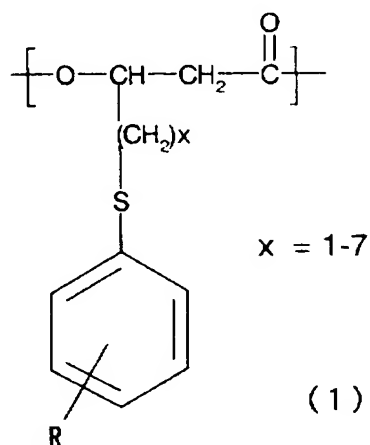
そこで本発明者らは、デバイス材料や医療用材料として有用な官能基を側鎖に有する P H A の開発をめざして、各種の P H A を生産し菌体内に蓄積する能力を有する微生物の探索及びこのような微生物を用いた所望の P H A の生産方法について鋭意研究を重ねてきた。本発明の概要は以下の通りである。

【 0 0 2 1 】

本発明は、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートに関するものである。

【 0 0 2 2 】

【化 1 9】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

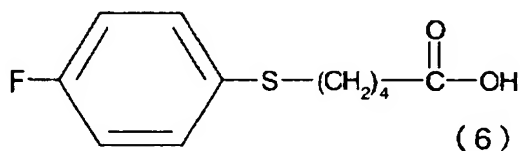
また、xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【0 0 2 3】

また、新規化合物である、化学式(6)で表される5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸に関するものである。

【0 0 2 4】

【化 2 0】

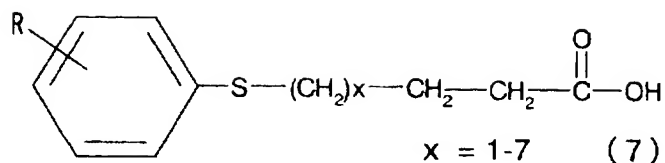


【0 0 2 5】

さらに、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含む培地中で微生物を培養することを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 2 6】

【化 2 1】



但し、Rは「ハロゲン原子、CN、NO₂、COOR'、SO₂R''

(R':H、Na、K、CH₃、C₂H₅; R'':OH、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅)」

から任意に選択される。

【0 0 2 7】

またさらに、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ有機酸或いはその塩とを含む培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 2 8】

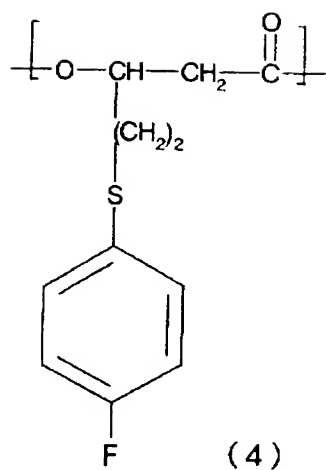
加えて、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつグルコースを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)と、これに続く、化学式(7)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、またグルコースを含み、かつ窒素源を含まない培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なうことを特徴とする、化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 2 9】

とりわけ、化学式(6)で示される5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸(以下、3HFTPxV)を含む培地中で微生物を培養し、化学式(4)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産すること、

【0 0 3 0】

【化 2 2】

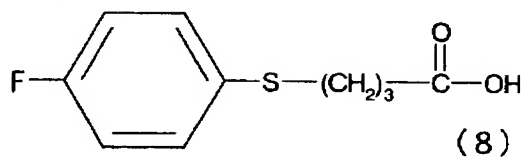


【0 0 3 1】

あるいは、化学式(8)で示される4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸（以下、3HFTP×B）を含む培地中で微生物を培養し、化学式(5)で示される3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)チオフェノキシ酪酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産すること

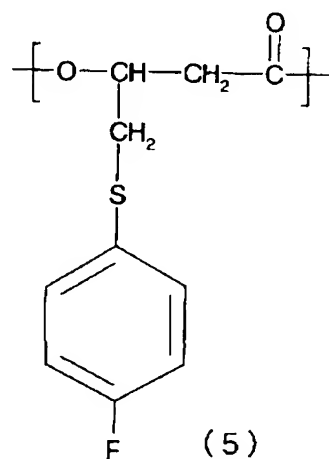
【0 0 3 2】

【化 2 3】



【0 0 3 3】

【化 2 4】



【0 0 3 4】

を特徴とする前記記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法に関するものである。

【0 0 3 5】

また加えて、前記微生物細胞からポリヒドロキシアルカノエートを回収する工程を含む前記記載の方法に関するものである。

【0 0 3 6】

本発明の新規なポリヒドロキシアルカノエートは、モノマーユニットとなるヒドロキシアルカン酸自体がチオエーテル構造を有する新規なものであり、この構造により高い反応性を有している。このポリヒドロキシアルカノエートは、PHA生産能力を有する微生物により、該ヒドロキシアルカン酸と増殖用炭素源を含んだ培地から生産されるものである。新規PHAの数平均分子量は 10000～30000 である。

【0 0 3 7】

【発明の実施の形態】

本発明の方法で用いる微生物は、化学式(7)で示される化合物を含む培地中で培養することにより化学式(1)で示すユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを生産しうる微生物であれば如何なる微生物であってもよいが、その一例としては、シュードモナス(Pseudomonas)属に属する微生物が挙げられる

。さらに詳しくは、微生物がシュードモナス・チコリアイ YN 2 株(*Pseudomonas cichorii* YN 2 ; F E R M B P-7375)、シュードモナス・チコリアイ H 4 5 株(*Pseudomonas cichorii* H45、F E R M B P-7374)、シュードモナス・ジェッセニイ P 161 株(*Pseudomonas jessenii* P 161、F E R M B P-7376)が挙げられる。これら 3 種の微生物は経済産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、特願平 1 1 - 3 7 1 8 6 3 号に記載されている微生物である。

【 0 0 3 8 】

以下に YN 2 株、H 4 5 株及び P 161 株についての詳細を示す。

< YN 2 株の菌学的性質 >

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	: 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0\mu\text{m}$
細胞の多形性	: なし
運動性	: あり
孢子形成	: なし
グラム染色性	: 陰性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、光沢、半透明

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F 試験	: 酸化型(非発酵性)
硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陽性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性

ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性
4 % NaClでの生育	:陽性(弱い生育)
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	:陰性(*)
Tween80の加水分解	:陽性

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

(3) 基質資化能

ブドウ糖	:陽性
L-アラビノース	:陽性
D-マンノース	:陰性
D-マンニトール	:陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	:陰性
マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dl-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

< H45株の菌学的性質 >

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	:桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.2\mu\text{m}$
細胞の多形性	:なし
運動性	:あり
胞子形成	:なし
グラム染色性	:陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
表層なめらか、光沢、クリーム色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F 試験	: 酸化型
硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β -ガラクトシダーゼ	: 陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	: 陽性
4% NaCl での生育	: 陰性
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	: 陰性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陰性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性

dl-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性

< P 161株の菌学的性質>

(1)形態学的性質

細胞の形と大きさ	:球状、 $\phi 0.6 \mu m$ 桿状、 $0.6 \mu m \times 1.5 \sim 2.0 \mu m$
細胞の多形性	:あり(伸長型)
運動性	:あり
孢子形成	:なし
グラム染色性	:陰性
コロニー形状	:円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、淡黄色

(2)生理学的性質

カタラーゼ	:陽性
オキシダーゼ	:陽性
O/F 試験	:酸化型
硝酸塩の還元	:陽性
インドールの生成	:陰性
ブドウ糖酸性化	:陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	:陽性
ウレアーゼ	:陰性
エスクリン加水分解	:陰性
ゼラチン加水分解	:陰性
β -ガラクトシダーゼ	:陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
dl-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

(培養工程)

本発明にかかる P H A の製造方法に用いる微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作成、P H A の生産に必要とされる菌数や活性状態を確保するための増殖などには、用いる微生物の増殖に必要な成分を含有する培地を適宜選択して用いる。例えば、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地(肉汁培地、酵母エキスなど)や、栄養源を添加した合成培地など、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は、用いる微生物に応じて適宜選択する。

【 0 0 3 9 】

前記したような P H A 生産微生物を用いて、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを製造するためには、P H A 生産用の原料として、該モノマーユニットに対応する、上記化学式(7)で示される化合物と、微生物の増殖用炭素源とを少なくとも含んだ無機培地などを用いることができる。上記化学式(7)で示される化合物は、培地あたり 0.01% から 1 % (w/v)、更に好ましくは 0.02% から 0.2 % の割合で含有していることが望ましい。水溶性は必ずしも良好ではないが、本

発明に示す微生物を用いれば、懸濁された状態であっても何ら問題は無い。また、場合によっては 1-ヘキサデセンや n-ヘキサデカンのような溶媒に溶解或いは懸濁された形で培地中に含有されることも可能である。この場合、該溶媒の濃度は培地溶液に対して 3 % 以下にすることが必要である。

【 0 0 4 0 】

増殖用炭素源としては、酵母エキスやポリペプトン、肉エキスといった栄養素を用いることが可能であり、更に、糖類、TCA 回路中の中間体として生じる有機酸、或いは TCA 回路から更に 1 段階ないしは 2 段階の生化学反応により得られる有機酸或いはその塩、アミノ酸或いはその塩、炭素数 4 から 12 の直鎖アルカン酸或いはその塩等、から用いる菌株に対する基質としての有用性で適宜選択することができる。

【 0 0 4 1 】

これらのうち、糖類としては、グリセロアルデヒド、エリスロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、

グリセロール、エリスリトール、キシリトール等のアルジトール、

グルコン酸等のアルドン酸、

グルクロン酸、ガラクトツロン酸等のウロン酸、

マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等

から選ばれる 1 つ以上の化合物が好適に利用できる。

【 0 0 4 2 】

また、有機酸或いはその塩としては、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、オキサロ酢酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸或いはその塩から選ばれる 1 つ以上の化合物が好適に利用できる。

【 0 0 4 3 】

また、アミノ酸或いはその塩としては、グルタミン酸、アスパラギン酸或いはその塩から選ばれる 1 つ以上の化合物が好適に利用できる。

【 0 0 4 4 】

これらの中では、ポリペプトンや糖類を用いるのが好ましく、また糖類の中で

はグルコース、フルクトース、マンノースからなる群から選択される少なくとも一つであることがより好ましい。これらの基質は通常培地あたり 0.1%から 5% (w/v)、更に好ましくは 0.2%から 2%の割合で含有していることが望ましい。

【0045】

微生物に PHA を生産・蓄積させる方法としては、一旦十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。具体的には、前記の工程を複数段接続した多段方式の採用が挙げられる。

【0046】

例えば、化学式(7)で示される化合物、及びポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、菌体を遠心分離等で回収したのち、これに続く、化学式(7)で示される化合物と有機酸或いはその塩とを含む(窒素源を含まない)培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なう方法、

あるいは、化学式(7)で示される化合物、及びグルコースを含む培地中で微生物を培養する工程(工程1)を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、菌体を遠心分離等で回収したのち、これに続く、化学式(7)で示される化合物とグルコースとを含む窒素源を含まない培地中で、工程1で培養された微生物を更に培養する工程(工程2)を行なう方法等である。

【0047】

培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、例えば 15~40℃、好ましくは 20~35℃、更に好ましくは 20℃から 30℃程度が適当である。

【0048】

培養は液体培養、固体培養等該微生物が増殖し、PHAを生産する培養方法ならいかなる培養方法でも用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーフェーマンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。

【 0 0 4 9 】

上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源(例えば、リン酸塩など)、窒素源(例えば、アンモニウム塩、硝酸塩など)等、当該微生物の増殖に必要な成分を含んでいるものであればいかなるものでも良く、例えば、MSB培地、M9培地等を挙げることができる。

【 0 0 5 0 】

本発明の一方法に用いた無機塩培地(M9培地)の組成を以下に示す。

【 0 0 5 1 】

[M9培地]

Na_2HPO_4 6.2 g

KH_2PO_4 3.0 g

NaCl 0.5 g

NH_4Cl 1.0 g

(培地 1 リットル中、pH 7.0)

更に、良好な増殖及びPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に以下に示す微量成分溶液を0.3% (v/v) 程度添加する必要がある。

【 0 0 5 2 】

[微量成分溶液]

ニトリロ三酢酸:1.5 ; MgSO_4 :3.0 ;

MnSO_4 :0.5 ; NaCl :1.0 ; FeSO_4 :0.1 ;

CaCl_2 :0.1 ; CoCl_2 :0.1 ; ZnSO_4 :0.1 ;

CuSO_4 :0.1 ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$:0.1 ;

H_3BO_3 :0.1 ; Na_2MoO_4 :0.1 ; NiCl_2 :0.1

(培地 1 リットル中、pH 7.0)

本発明にかかる培養液からのPHAの取得には、通常行なわれている方法を適用することができる。PHAが培養液中に分泌される場合は、培養液からの抽出精製方法が、また、菌体に蓄積される場合は、菌体からの抽出精製方法が用いら

れる。例えば、微生物の培養菌体からの P H A の回収には、通常行なわれているクロロホルムなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、クロロホルム以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、アセトンが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、S D S 等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、E D T A による処理によって P H A 以外の菌体成分を除去して、菌体内成分を除去することによって P H A のみを回収する方法を採ることもできる。

【 0 0 5 3 】

なお、本発明の微生物の培養、本発明の微生物による P H A の生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からの P H A の回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【 0 0 5 4 】

以下に実施例を示す。なお、以下における「%」は特に標記した以外は重量基準である。

【 0 0 5 5 】

【実施例】

[実施例 1] F T P x V A の合成

四つ口丸底フラスコに、240mLの脱水アセトンを入れ、炭酸カリウム 15.20g(0.11mol)を加え、窒素雰囲気下で攪拌した。この溶液にヨウ化ナトリウム 9.00g(0.06mol)、4-フルオロベンゼンチオール 8.97g(0.07mol)を加えて、室温、窒素雰囲気下で十分攪拌した。更に、5-ブromo吉草酸エチル 12.55g(0.06mol)を加え、65℃、18時間加熱還流した。

【 0 0 5 6 】

反応終了後、アセトンをロータリーエバポレーターにより留去し、クロロホルムに再溶解し、水を加えて分液し、有機相を無水硫酸マグネシウムにて脱水した後、クロロホルムをロータリーエバポレーターにより留去し、真空ポンプにより乾燥し、粗製の5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸エチルを 14.78g(ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法によるGC-MSピーク比 93.55%))を得た。

【 0 0 5 7 】

ここで得られた粗製の 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸エチルは、精製せず次の加水分解反応を行なった。

【 0 0 5 8 】

得られたエステル粗製物 14.78g をエタノール-水 (1:9 (V/V)) 混合液 300 mL に溶解し、10 倍 mol 量の水酸化カリウムを加えて、氷浴下で 4 時間反応した。

【 0 0 5 9 】

この反応液を 0.1 mol/L 塩酸水溶液約 2 L 中に注ぎ、沈殿化させ、沈殿物は濾過することで取り出した。ここで得られた反応物は、真空ポンプにより乾燥し、粗製の 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸を得た。

【 0 0 6 0 】

ここで得られた粗製の 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸は、少量の熱エタノール-ヘキサン溶媒に溶解させ、徐々に冷却して再結晶し、真空ポンプにより乾燥することで目的の化合物である 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸を得た。

【 0 0 6 1 】

ここで得られた 5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸の収量は、9.02g であった。

【 0 0 6 2 】

また、全収率は、5-ブロモ吉草酸エチル基準で 65.9% であった。

【 0 0 6 3 】

得られた化合物は、以下の条件で NMR 分析を行なった。

<測定機器> FT-NMR: Bruker DPX400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H

使用溶媒: CDCl_3

reference: キャピラリ封入 TMS / CDCl_3

測定温度: 室温

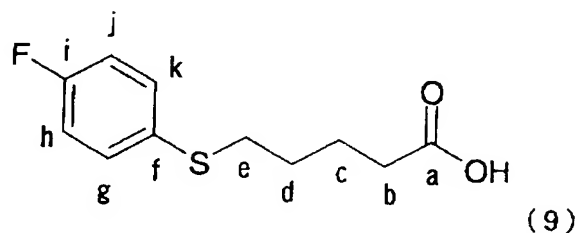
^1H -NMR スペクトルチャートを図 1 に、その同定結果を表 1 にそれぞれ示す

【0064】

この結果から、所望とする化学式(9)で表される新規化合物である5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸が合成された。

【0065】

【化25】



【0066】

【表1】

表1 ^1H -NMRスペクトル同定結果(図1参照)

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
1.65	2	m	d
1.76	2	m	c
2.36	2	t	b
2.87	2	t	e
6.99	2	m	h,j
7.34	2	m	g,k
8.40~12.00	1	br	OH

【0067】

以下、5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸を含む培地でPHA生産菌を培養して3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸ユニットを主成分とするPHAを製造した例を挙げる(実施例2~8)。

【0068】

[実施例2]

ポリペプトン 0.5%、FTP×VA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培

養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0069】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 86mg得た。

【0070】

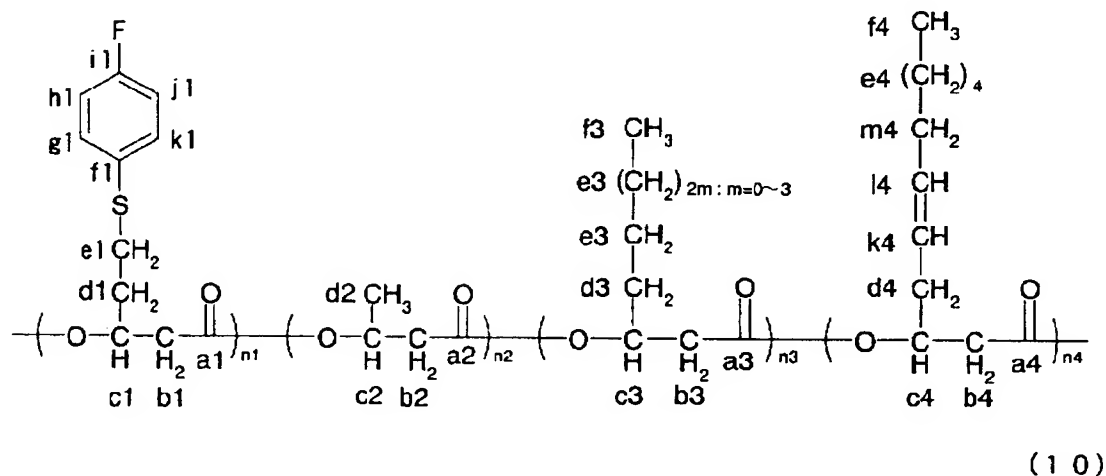
得られたPHAは、実施例1と同様の分析条件でNMR分析を行なった。

【0071】

^1H -NMRスペクトルを図2に、その帰属結果を表2に示す。表2に示す通り、当該PHAは3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸をモノマーユニットとして含む、化学式(10)で表されるPHAであることが確認された。

【0072】

【化26】



【0073】

【表 2】

表 2 ^1H -NMR スペクトル同定結果(図 2 参照)

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
1.86	2	m	d l
2.52	2	m	h l
2.82	2	m	e l
5.26	1	m	e l
6.95	2	m	h l, j l
7.30	2	m	g l, k l

【 0 0 7 4 】

更に、得られた PHA は、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHA モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表 3 に示した。

【 0 0 7 5 】

また、この PHA の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー HLC-8220、カラム; 東ソー TSK-GEL SuperHM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した結果、 $M_n=95600$ 、 $M_w=291300$ であった。

【 0 0 7 6 】

【表 3】

表3 シュードモナス・チコリアイ・YN2株によるPHA生産

菌体乾燥重量	960mg/L
ポリマー乾燥重量	430mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	44.8 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	14.2 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.0 %
3-ヒドロキシオクタン酸	0.0 %
3-ヒドロキシデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデセン酸	0.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	85.8 %

【0077】

[実施例 3]

ポリペプトン 0.5%、F T P×V A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0078】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌してP H Aを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してP H Aを 44mg得た。

【0079】

得られたP H Aは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、P H Aモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表4に示した。表4に示す通り、当該P H Aは3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸をモノマーユニットとして含む、化学式(10)で表されるP H Aであることが確認された。

【0080】

【表 4】

表4 シュードモナス・チコリアイ・1115 株によるPHA生産

菌体乾燥重量	710mg/L
ポリマー乾燥重量	220mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	31.0 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	7.5 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.0 %
3-ヒドロキシオクタン酸	0.0 %
3-ヒドロキシデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデセン酸	0.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	92.5 %

【0081】

[実施例 4]

ポリペプトン 0.5%、F T P×V A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・P161 株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0082】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 45mg得た。

得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表5に示した。表5に示す通り、当該PHAは3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸をモノマーユニットとして含む、化学式(10)で表されるPHAであることが確認された。

【0083】

【表 5】

表5 シュードモナス・ジェッセニイ・P161 株によるPHA生産

菌体乾燥重量	975mg/L
ポリマー乾燥重量	225mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	26.2 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0.5 %
3-ヒドロキシヘキサノ酸	0.0 %
3-ヒドロキシオクタン酸	0.4 %
3-ヒドロキシデカン酸	0.4 %
3-ヒドロキシドデカン酸	0.0 %
3-ヒドロキシドデセン酸	0.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	98.7 %

【0084】

[実施例 5]

D-グルコース 0.5%、F T P x V A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、F T P x V A 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0085】

この凍結乾燥ペレットを 20mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 180mg得た。

【0086】

得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表6に示した。表6に示す通り、当該PHAは、3HFTPVをモノマーユニットとして含む、化学式(10)で表されるPHAであることが確認された。

【0087】

【表6】

表6 シュードモナス・チコリアイ・YN2株によるPHA生産

菌体乾燥重量	1630 mg/L
ポリマー乾燥重量	900 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	55.2 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0.5 %
3-ヒドロキシヘキサノ酸	0.8 %
3-ヒドロキシオクタノ酸	6.6 %
3-ヒドロキシデカン酸	11.8 %
3-ヒドロキシドデカン酸	3.7 %
3-ヒドロキシドデセン酸	6.5 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	70.1 %

【0088】

【実施例6】

D-グルコース 0.5%、FTPxVA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTPxVA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0089】

この凍結乾燥ペレットを 20mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 169mg得た。

【0090】

得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモ

ノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表7に示した。表7に示す通り、当該PHAは、3HFTP×Vをモノマーユニットとして含む、化学式(10)で表されるPHAであることが確認された。

【0091】

【表7】

表7 シュードモナス・チコリアイ・H45株によるPHA生産

菌体乾燥重量	1445mg/L
ポリマー乾燥重量	840mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	58.1 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	10.6 %
3-ヒドロキシヘキサノ酸	0.7 %
3-ヒドロキシオクタン酸	7.7 %
3-ヒドロキシデカン酸	14.9 %
3-ヒドロキシドデカン酸	3.8 %
3-ヒドロキシドデセン酸	5.0 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	57.3 %

【0092】

【実施例7】

D-グルコース 0.5%、FTP×VA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTP×VA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁し、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0093】

この凍結乾燥ペレットを 20mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 143mg得た。

【0094】

得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行なった後、ガスクロマトグ

ラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行なった。その結果を表8に示した。表8に示す通り、当該PHAは、3HFTP×Vをモノマーユニットとして含む、化学式(10)で表されるPHAであることが確認された。

【0095】

【表8】

表8 シュードモナス・ジェッセイ・P161株によるPHA生産

菌体乾燥重量	1105mg/L
ポリマー乾燥重量	715mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	64.7 %
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0.0 %
3-ヒドロキシヘキサン酸	0.7 %
3-ヒドロキシオクタン酸	5.3 %
3-ヒドロキシデカン酸	12.2 %
3-ヒドロキシドデカン酸	2.9 %
3-ヒドロキシドデセン酸	3.8 %
3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸	75.1 %

【0096】

次に、4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸を含む培地でPHA生産菌を培養して3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸ユニットを主成分とするPHAを製造した例を挙げる(実施例8～18)。

【0097】

[実施例8]

D-グルコース 0.5%、FTP×BA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。96時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTP×BA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁し、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0098】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌し

て P H A を抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 64mg 得た。

【0 0 9 9】

得られた P H A は、以下の条件で N M R 分析を行なった。

<測定機器> F T - N M R : B r u k e r D P X 4 0 0

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400\text{MHz}$ 、 $^{13}\text{C} = 100\text{MHz}$

<測定機器> 測定核種: ^1H 、 ^{13}C

使用溶媒: CDCl_3

reference: キャピラリー封入 T M S / CDCl_3

測定温度: 室温

^1H -N M R、 ^{13}C -N M R スペクトルチャートをそれぞれ図 4、図 5 に、その同定結果を表 9、表 1 0 にそれぞれ示す。

【0 1 0 0】

【表 9】

表 9 ^1H -N M R スペクトル同定結果

Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
2.59	2	m	c1
3.03	2	m	b1
5.22	2	quint	d1
6.96	2	m	g1,i1
7.35	2	m	f1,j1

【0 1 0 1】

【表 1 0】

表 1 0 ^{13}C -NMR スペクトル同定結果

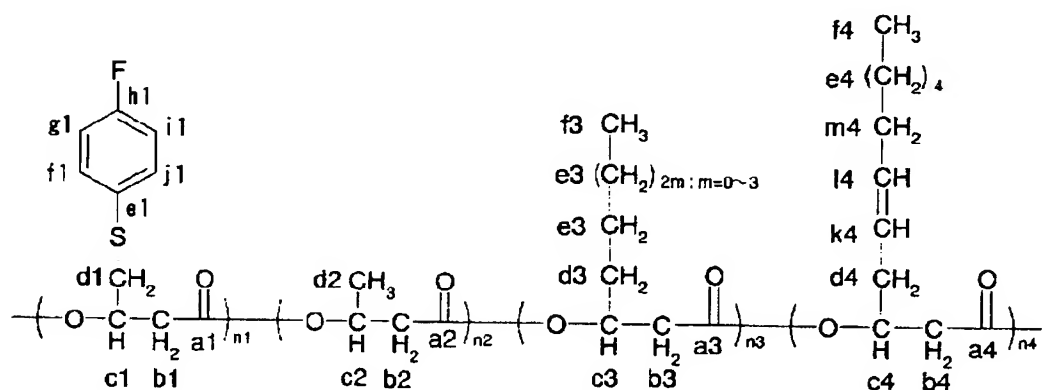
Chemical shift (ppm)	分裂	同定結果
37.4	s	b1 or c1
38.0	s	b1 or c1
69.4	s	d1
116.0 & 116.3	d	g1, i1
129.8 & 129.8	d	e1
132.7 & 132.8	d	f1, j1
160.7 & 163.1	d	h1
168.7	s	a1

【0 1 0 2】

表 9 及び表 1 0 に示す通り、当該 P H A は 3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸をモノマーユニットとして含む、化学式(1 1)で表される P H A であることが確認された。また得られた P H A は、NMR より 3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 79.5 mol% 含むことがわかった。

【0 1 0 3】

【化 2 7】



(1 1)

【0 1 0 4】

また、得られた P H A の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(G P C ; 東ソー H L C - 8220、カラム ; 東ソー T S K - G E L S u p e r H M - H、溶媒 ; クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した結果、 $M_n = 19800$ 、 M

w=41500 であった。

【0105】

[実施例9]

D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シェードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。96時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0106】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを4mg得た。

【0107】

得られたPHAは、実施例9と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを78.9mol%含むことがわかった。

【0108】

[実施例10]

D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シェードモナス・ジェッセニイ・P 161 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。96 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。72 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0109】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過

した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを6mg得た。

【0110】

得られたPHAは、実施例2と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを73.4mol%含むことがわかった。

【0111】

[実施例11]

ポリペプトン 0.5%、FTPxBA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0112】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを70mg得た。

得られたPHAは、実施例2と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを65.7mol%含むことがわかった。

【0113】

[実施例12]

ポリペプトン 0.5%、FTPxBA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、FTPxBA 0.1%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9培地 200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。47時間後、菌体を遠心分

離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0114】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 6 mg 得た。

【0115】

得られた PHA は、実施例 2 と同様の条件で NMR 分析を行なった結果、得られた PHA は、NMR より 3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 53.7mol% 含むことがわかった。

【0116】

[実施例 13]

ポリペプトン 0.5%、FTPxBA 0.1% とを含む M9 培地 200mL に、シュードモナス・ジェッセニイ・P161 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、FTPxBA 0.1% を含む、窒素源 (NH_4Cl) を含まない M9 培地 200mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。47 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0117】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 7 mg 得た。

【0118】

得られた PHA は、実施例 2 と同様の条件で NMR 分析を行なった結果、得られた PHA は、NMR より 3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 35.8mol% 含むことがわかった。

【0119】

[実施例 14]

グルタミン酸ナトリウム 0.5%、F T P × B A 0.1%とを含むM 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 1 2 0 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 14mg 得た。

【 0 1 2 1 】

得られた P H A は、実施例 2 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 18.7mol% 含むことがわかった。

【 0 1 2 2 】

[実施例 1 5]

ポリペプトン 0.5%、F T P × B A 0.1%とを含むM 9 培地 200mL に、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【 0 1 2 3 】

この凍結乾燥ペレットを 20mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して P H A を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して P H A を 6 mg 得た。

【 0 1 2 4 】

得られた P H A は、実施例 2 と同様の条件で N M R 分析を行なった結果、得られた P H A は、N M R より 3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 44.6mol% 含むことがわかった。

【 0 1 2 5 】

[実施例 1 6]

酵母エキス 0.5%、FTP×BA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0 1 2 6】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 10mg得た。

【0 1 2 7】

得られたPHAは、実施例2と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 56.8mol%含むことがわかった。

【0 1 2 8】

[実施例 1 7]

n-ノナン酸 0.1%、FTP×BA 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0 1 2 9】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを 38mg得た。

【0 1 3 0】

得られたPHAは、実施例2と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたPHAは、NMRより3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 5.2mol%含むことがわかった。

【0131】

[実施例18]

n-オクタン酸 0.1%、F T P x B A 0.1%とを含むM9培地 200mLに、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0132】

この凍結乾燥ペレットを 20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で 20時間攪拌してP H Aを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してP H Aを 34mg得た。

【0133】

得られたP H Aは、実施例2と同様の条件でNMR分析を行なった結果、得られたP H Aは、NMRより3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸のモノマーユニットを 6.0mol%含むことがわかった。

【0134】

表11は、実施例9～19における菌体乾燥重量、ポリマー乾燥重量、ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量及び得られたポリマーの3 H T P x Bユニットのmol%を示したものである。

【0135】

【表 11】

表 11

	乾燥菌体重量 (mg/L)	乾燥ポリマー 重量(mg/L)	菌体重量/ポリマー重量 (%)	3HTPxB ユニットmol%
実施例 8	720	320	44.4	79.5
実施例 9	435	20	4.6	78.9
実施例 10	390	30	7.7	73.4
実施例 11	920	350	38.0	65.7
実施例 12	470	30	6.4	53.7
実施例 13	405	35	7.4	35.8
実施例 14	785	90	11.5	18.7
実施例 15	575	30	5.2	44.6
実施例 16	710	50	7.0	56.8
実施例 17	410	190	46.3	5.2
実施例 18	400	170	42.5	6.0

【0136】

【発明の効果】

本発明により、側鎖にチオフェノキシ構造を有するユニット、例えば3-ヒドロキシ-4-(4-フルオロチオフェノキシ)酪酸をモノマーユニットとして含む新規ポリヒドロキシアлкаノエートと、3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸ユニットをモノマーユニットとして含む新規ポリヒドロキシアлкаノエートが提供される。また、これらのポリヒドロキシアлкаノエートの微生物を用いて生産する方法が提供される。

【0137】

これにより、機能性ポリマーとして有用なポリヒドロキシアлкаノエートが効率的に生産でき、デバイス材料や医薬材料等の各分野への応用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸の¹H-NMRスペクトルチャートである。

【図 2】

実施例 2 により得られた PHA の¹H-NMR スペクトルチャートである。

【図 3】

実施例 4 により得られた PHA をメタノリシス処理した GC-MS の TIC 及び

3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸メチルのMSスペクトルである。

【図 4】

実施例 8 により得られた P H A の ^1H -NMR スペクトルチャートである。

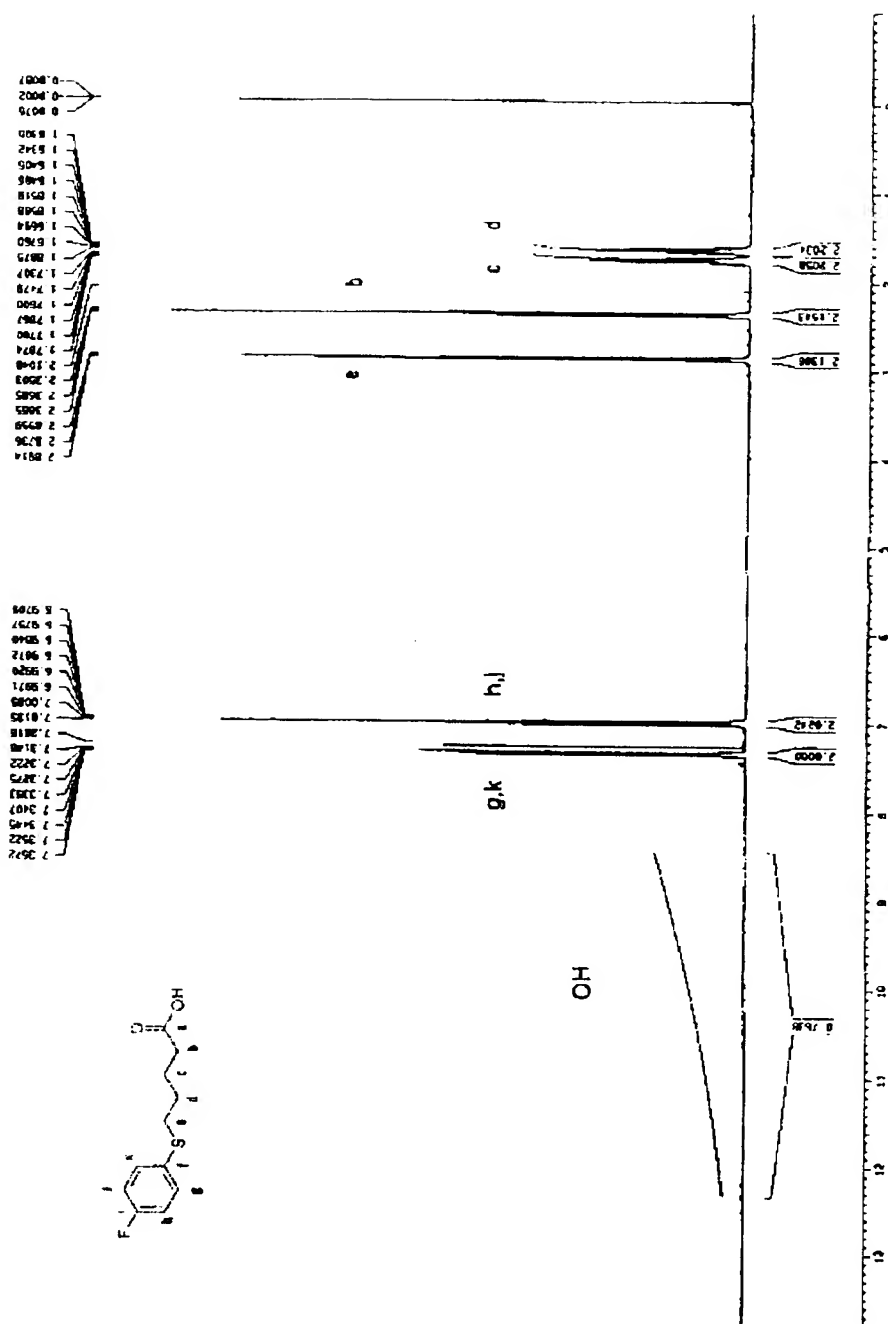
【図 5】

実施例 8 により得られた P H A の ^{13}C -NMR スペクトルチャートである。

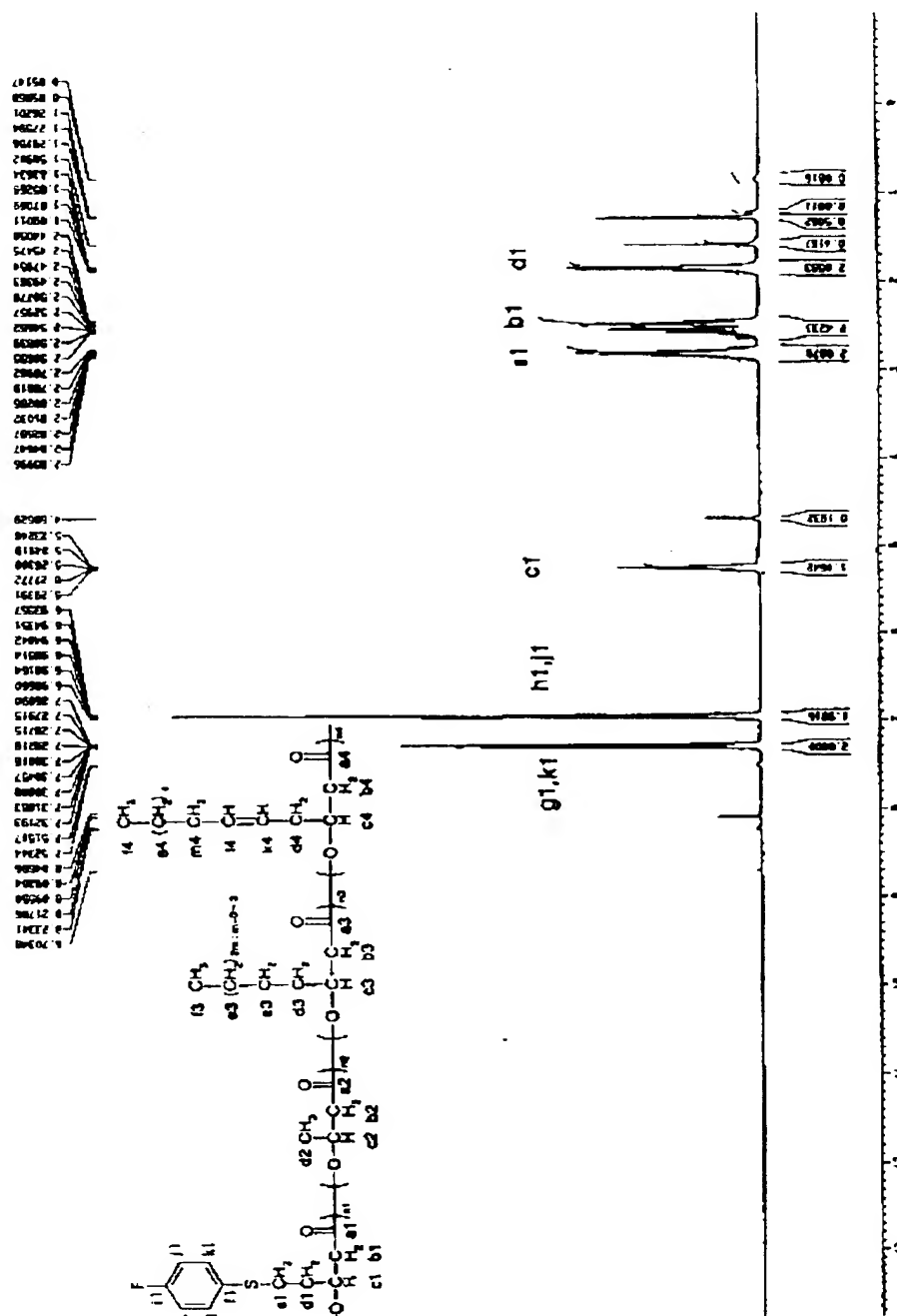
【書類名】

図面

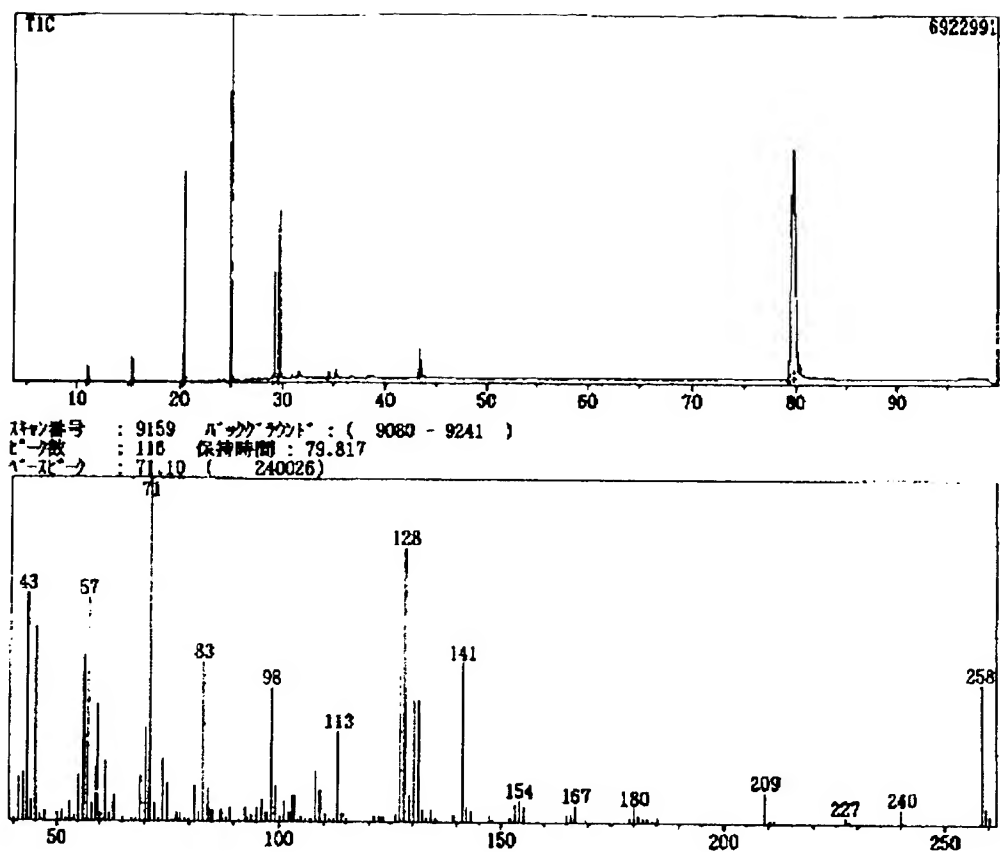
【図 1】



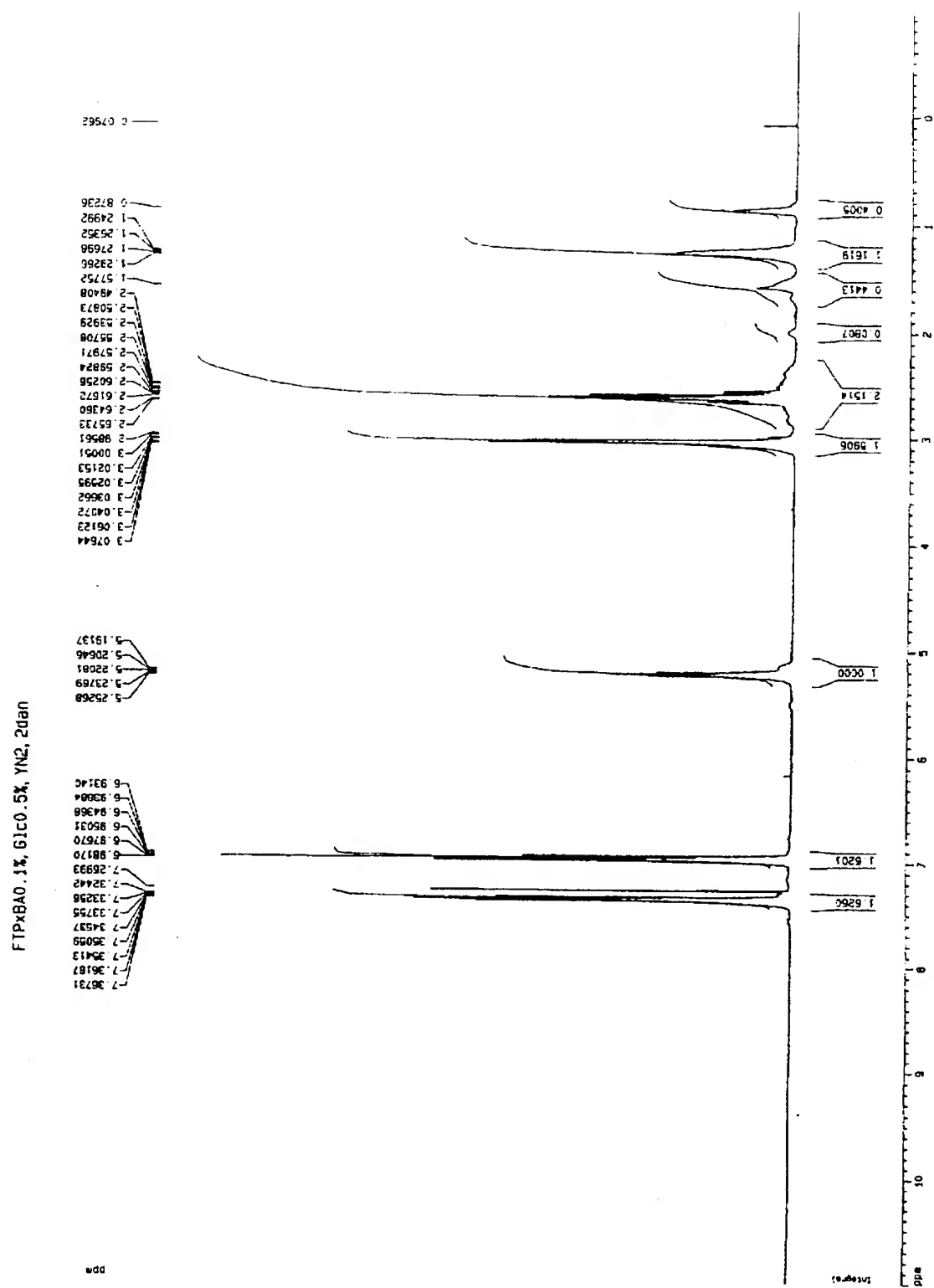
【図 2】



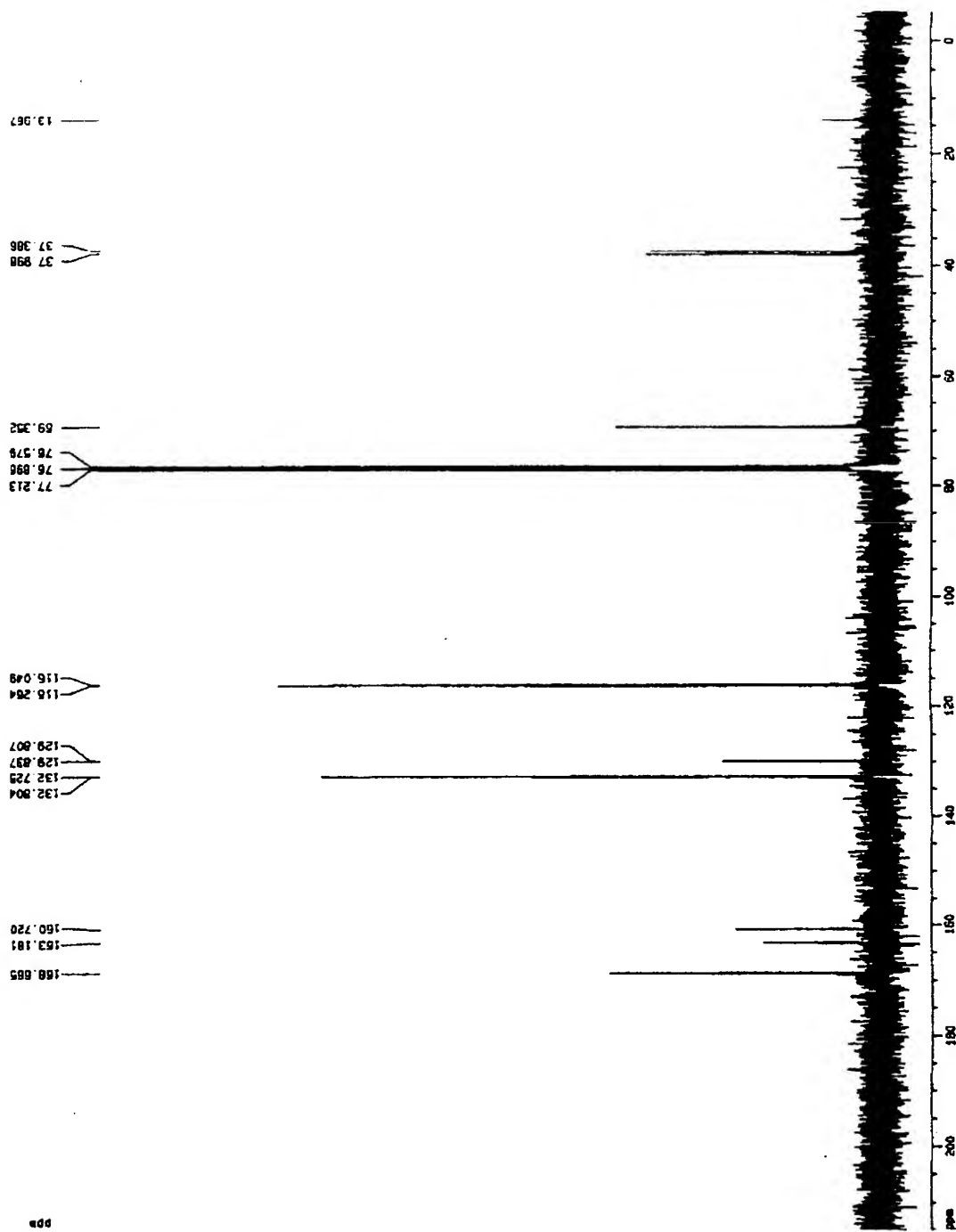
【図 3】



【図 4】



【図 5】



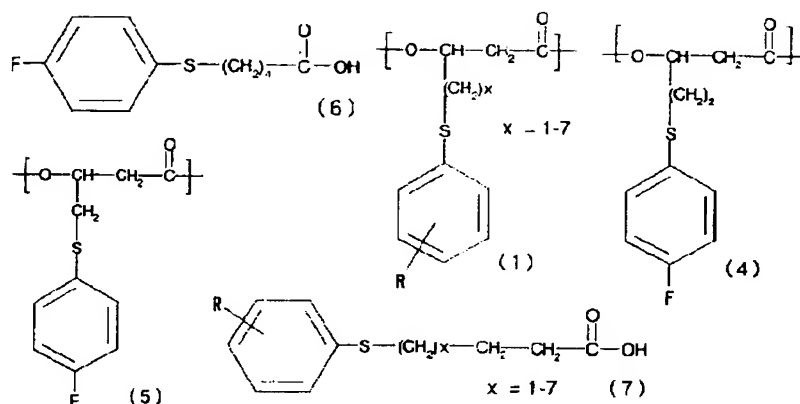
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 チオエーテル構造を有する新規ヒドロキシアルカン酸と、これらの側鎖にチオエーテル構造を有するユニットを含む新規なPHA、およびその製造方法を提供する。

【解決手段】 下記化学式(6)で表される5-(4-フルオロチオフェノキシ)吉草酸。下記化学式(1),特に,化学式(4)(5)で示されるモノマーユニットを含むPHA,さらに化学式(7)で示される化合物を含む培地中で培養した微生物細胞からPHAを回収する工程を含むPHAの製造方法。

【化1】



但し, Rは「ハロゲン原子, CN, NO₂, COOR', SO₂R'' (R': H, Na, K, CH₃, C₂H₅; R'': OH, ハロゲン原子, OCH₃, OC₂H₅)」から任意に選択される。また, xは化学式中に示した範囲内で任意の整数値を一つ以上とり得る。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社